



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109644863 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201910026024.7

(22)申请日 2019.01.11

(71)申请人 山西省农业科学院农作物品种资源研究所

地址 030000 山西省太原市龙城北街161号

(72)发明人 张丽君 刘龙龙 马名川

(74)专利代理机构 西安汇智创想知识产权代理有限公司 61247

代理人 李恒

(51) Int. Cl.

A01H 1/02(2006.01)

A01H 1/04(2006.01)

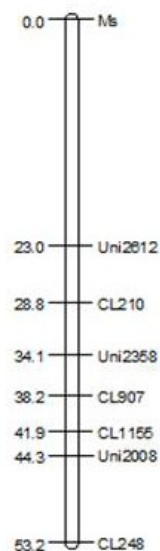
权利要求书2页 说明书7页  
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

燕麦隐性核不育基因分子标记及应用

(57)摘要

本发明公开了燕麦隐性核不育系RI2014的生产方法及燕麦隐性核不育系RI2014的用途,以及燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法,对RIS2014燕麦隐性核不育系RI2014进行引物PCR,引物编号为CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248,Uni2008,将控制RI2014S不育系育性性状的基因定位于染色体23.0Mb区段内。本发明公开的的突变体RI2014本身具有高产性能,不仅可以作为不育系省去人工去雄杂交份繁琐,而且在育种过程中还具备优良亲本功能。使用本发明公开的燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法,在植株的鉴定、品种的遗传背景、筛选目标单株,在品种改良和产量构成以及克隆性分化控制基因等方面有重要的应用意义。



1. 一种燕麦隐性核不育系RI2014的生产方法,其特征在于:包括以下步骤:

将原始发现的隐形核不育皮燕麦“CAMS”和裸燕麦“80066”杂交,杂交种通过自交一代获得F<sub>2</sub>代,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”回交、自交一代得到BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交、自交一代得到BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交、自交一代得到BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>,通过单粒传法构建重组自交系,在F<sub>12</sub>代筛选得到的裸燕麦不育系RI 2014。

2. 权利要求1所述的一种燕麦隐性核不育系RI2014的用途,其特征在于,燕麦隐性核不育系RI2014与不同皮燕麦、裸燕麦杂交得到的F<sub>1</sub>均可育。

3. 一种燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法,其特征在于:以编号为CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248,Uni20087对引物,进行PCR扩增,将所得产物利用聚丙烯酰胺凝胶检测,能够进行扩增的即为含有不育基因的单株,结合单株表型,将控制RI2014S不育系育性性状的基因定位于染色体23.0Mb区段内,所述的编号为CL1155的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:1所示,所述的编号为CL1155的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:2所示,所述的编号为CL907的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:3所示,所述的编号为CL907的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:4所示,所述的编号为CL210的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:5所示,所述的编号为CL210的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:6所示,所述的编号为Uni2358的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:7所示,所述的编号为Uni2358的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:8所示,所述的编号为Uni2612的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:9所示,所述的编号为Uni2612的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:10所示,所述的编号为CL248的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:11所示,所述的编号为CL248的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:12所示,所述的编号为Uni20087的正向引物序列如序列表中SEQ ID NO:13所示,所述的编号为Uni20087的反向引物序列如序列表中SEQ ID NO:14所示。

4. 根据权利要求3所述的一种燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法,其特征在于:具体包括以下步骤:

(1) 以燕麦品种品燕2号作为父本,以所得到的不育单株RI2014S作为母本,杂交得到F<sub>1</sub>代,利用F<sub>1</sub>代自交一代得到育性分离的F<sub>2</sub>群体,通过田间性状调查表明:不育单株:可育单株分离比为1:3,

(2) 提取F<sub>2</sub>群体单株总DNA,取10株可育单株的总DNA等量混合作为可育池模板,取10株不育单株的总DNA等量混合作为不育池模板,

(3) 采用皮燕麦隐性核不育植株的近等基因系CAMS1进行转录组测序开发的2073对标记作为引物,进行PCR扩增,

(4) 将所得的扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶检测,筛选得到多态性标记;以获得的多态性标记引物7对,引物编号为CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248,Uni2008,

(5) 以F<sub>2</sub>群体全部单株为模板进行PCR扩增,将所得产物利用聚丙烯酰胺凝胶检测,能够进行扩增的即为含有不育基因的单株,结合单株表型,将控制RI2014不育系育性性状的基因定位于染色体23.0Mb区段内。

5. 一种燕麦雄性不育系RI2014在燕麦轮回育种中的应用方法,其特征在于,其具体步骤如下:

(1) 将鉴定为性状优良的良好亲本材料分别编号1、2、3、4,将亲本材料1与2杂交得到F<sub>1A</sub>,将亲本材料3与4杂交得到F<sub>1B</sub>;

(2) 以步骤(1)中得到的F<sub>1A</sub>和F<sub>1B</sub>分别作父本,以RI 2014不育系作母本进行杂交,其中F<sub>1A</sub>和RI 2014S不育单株杂交得到F<sub>1C</sub>,通过自交一代得到F<sub>2C</sub>;F<sub>1B</sub>与RI 2014S不育单株杂交得到F<sub>1D</sub>,通过自交一代得到F<sub>2D</sub>;

(3) 以F<sub>2C</sub>中的不育单株作为母本,以F<sub>1B</sub>为父本杂交得到F<sub>1</sub>,将F<sub>1</sub>自交一代得到F<sub>2</sub>,测验F<sub>2</sub>的育性,得到杂合株系,对杂合株系自交后代进行筛选,得到株高、花期适中的杂合株,对杂合株系自交8-9代得到性能稳定的品种。

6. 根据权利要求5所述的一种燕麦雄性不育系RI2014在燕麦轮回育种中的应用方法,其特征在于,所述的步骤(3)以F<sub>2D</sub>中的不育单株作为母本,以F<sub>1A</sub>为父本杂交得到F<sub>1</sub>,将F<sub>1</sub>自交一代得到F<sub>2</sub>,测验F<sub>2</sub>的育性,得到杂合株系,对杂合株系自交后代进行筛选,得到株高、花期适中的杂合株,对杂合株系自交8-9代得到性能稳定的品种。

7. 根据权利要求5或6所述的一种燕麦雄性不育系RI2014在燕麦轮回育种中的应用方法,其特征在于,选择F<sub>2C</sub>和F<sub>2D</sub>中表型优良利于育种的单株,选择不育单株时,利用权利要求3所述的燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法鉴定其中的不育单株和可育单株。

## 燕麦隐性核不育基因分子标记及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于燕麦育种技术领域,尤其涉及一种燕麦隐性核不育系基因分子标记及应用。

### 背景技术

[0002] 育性是燕麦的重要性状,在燕麦生产上有着重要的意义。燕麦雄性不育的研究最早于二十世纪八十年代,目前我国发现了两种燕麦不育类型:皮燕麦隐性核不育和裸燕麦显性核不育,国外关于燕麦雄性不育的发现还未见报道。燕麦核隐性不育经典遗传学研究表明,不育性状由一对隐性核基因控制,该材料命名为CA雄性不育(CAMS)。CAMS主要用于燕麦杂交组合的配制、轮回选育、群体改良以及杂交制种等多种用途。由于燕麦具有复杂且庞大的基因组(异源6倍体,分A、C、D三组,6n=42),尚未进行基因组测序,关于燕麦基因组分析和重要基因的定位多是依靠分子标记技术进行。

[0003] 雄性不育是植物中普遍存在的一种生物学现象,也是杂种优势利用的一种途径。植物雄性系不育指一种雄性生殖器官发育异常或退化(主要是花药或者花粉退化),但是雌性生殖器官发育正常的母本燕麦材料,由于花药或花粉早期发育异常造成无花粉型或无生活力花粉,不能自花授粉结实,只有依靠外来花粉才能受精结实。燕麦属自花授粉植物,为无限花序,随抽穗随开花,一般抽穗后2-3d内开花。开花是从顶部向基部发展,开花时雌雄蕊同时成熟,一般单株的抽穗开花在1周内完成。当单株燕麦顶部开始抽穗开花时顶部以下的雌雄蕊还处在发育阶段,而且越往下所处的发育阶段越靠前。授粉是在花内外稃开始开放时或开放前开始的,所以天然杂交率极低,仅为万分之一。因此这种隐形核不育燕麦作为遗传工具,通过人工辅助授粉的方法,就能产生大量杂交种子,是杂交燕麦最成功的遗传工具。

[0004] 皮燕麦和裸燕麦之间亲缘关系较远,种间杂交存在着巨大的育种潜力,其杂种F<sub>1</sub>在产量、品质和抗逆性等方面具有很强的杂种优势。然而,由于皮裸杂种优势在实际应用上遇到很大困难,包括花期不遇、结实率低等一系列问题,其中最主要是皮裸杂种F<sub>1</sub>代结实率较低,多数杂种的结实率在5%-50%之间。

[0005] 皮、裸燕麦种间杂交,其杂种后代的子粒性状表现为混合遗传。植株穗部同时存在着裸粒型和带批型两类子粒,裸粒型子粒在果穗上的分布与燕麦幼穗分化的先后次序相吻合。获得光合产物较为充足的穗顶端小穗和侧枝顶端小穗的基部小花产生的子粒,形成裸粒型子粒,而果穗中下部特别是侧枝下部的小穗多形成带俘型子粒。从F<sub>2</sub>开始对入选的单株进行隔离脱粒,选用裸粒型子粒作为下一代的选择系,逐代连续单株粒选,淘汰全皮类型或带批子粒多的单株,自交纯合直至稳定,性状稳定一般需8代甚至更长时间,兼顾目标性状在全裸或裸粒子粒多的单株上的综合表现,直到选育出理想株系并表现稳定遗传。

[0006] 分子标记,是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的遗传标记,是DNA水平遗传多态性的直接反映。广义的分子标记是指可遗传的并可检测的DNA序列或蛋白质,狭义的分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性的特性DNA片段。随

着分子标记技术的发展,获得了与燕麦不育性状连锁的分子标记,对植株的鉴定、品种的遗传背景、筛选目标单株,在品种的改良、克隆基因等方面有重要的应用意义。

### 发明内容

[0007] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供了燕麦隐性核不育系RI2014的生产方法及燕麦隐性核不育系RI2014的用途,以及燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法,其中包括在轮回选择中的应用。

[0008] 本发明是这样实现的:将原始发现的隐形核不育皮燕麦“CAMS”和裸燕麦“80066”杂交,杂交种通过自交一代获得F<sub>2</sub>代,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”回交、自交一代得到BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交、自交一代得到BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>,选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交、自交一代得到BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>,通过单粒传法构建重组自交系,在F<sub>12</sub>代筛选得到的裸燕麦不育系RI 2014。

[0009] 一种燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法

(1)以燕麦品种品燕2号作为父本,以所得到的不育单株RI2014S作为母本,杂交得到F<sub>1</sub>代,利用F<sub>1</sub>代自交一代得到育性分离的F<sub>2</sub>群体,通过田间性状调查表明:不育单株:可育单株分离比为1:3,

(2)提取F<sub>2</sub>群体单株总DNA,取10株可育单株的总DNA等量混合作为可育池模板,取10株不育单株的总DNA等量混合作为不育池模板,

(3)采用皮燕麦隐性核不育植株的近等基因系CAMS1进行转录组测序开发的2073对标记作为引物,进行PCR扩增,

(4)将所得的扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶检测,筛选得到多态性标记;以获得的多态性标记引物7对,引物编号为CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248,Uni2008,

(5)以F<sub>2</sub>群体全部单株为模板进行PCR扩增,将所得产物利用聚丙烯酰胺凝胶检测,能够进行扩增的即为含有不育基因的单株,结合单株表型,将控制RI2014不育系育性性状的基因定位于染色体23.0Mb区段内。

[0010] 所述引物的DNA序列为:

CL1155. GACATTGTCAAGACCTGTAAGCC;GCTCATGCCCTAACATTACAAC;

CL907. CTCATGTGAATGGAAGCCTGTAT;AACAAAGACTTCGGTGCATTCT;

CL210. TCTTGAAGGTCTGTTCTCTGAC;AAGAAGATAGAAGCCAAATCCGA;

Uni2358. TGAGAACACAATTGCTCAAAATG;CTGAAGTTTGGAGAACCAGAAGT;

Uni2612. CTCCTCTTCATGCCATTGTTAT;CTCCATGGCAACAAACTTAAC;

CL248. GGAATGCCATAACATGTACACAA;CCGACAGGATACACTGAGCG;

Uni2008. CTCTTCTCCTCTGCTCCTTCTT;CTTTCTGAGCAAGCACCATTAGT。

[0011] 编号为CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248,Uni2008的引物DNA序列的前半部分为正向引物,DNA序列的后半部分为反向引物。

[0012] 以不育系RI 2014S中的不育单株作母本,分别以皮燕麦和裸燕麦作父本授粉杂交,得到F<sub>1</sub>,观察F<sub>1</sub>的结实率;

将带有鉴定为隐形雄性核不育基因的不育系作为轮回选择的中间材料培育新品种,申请人提供了燕麦雄性不育系RI2014在燕麦轮回育种中的应用方法,,其具体步骤如下:

1) 将鉴定为性状优良的良种亲本材料分别编号1、2、3、4,将亲本材料1与2杂交得到F<sub>1A</sub>,将亲本材料3与4杂交得到F<sub>1B</sub>;

2) 以步骤1)中得到的F<sub>1A</sub>和F<sub>1B</sub>分别作父本,以RI 2014S不育系作母本进行杂交,其中F<sub>1A</sub>和RI 2014不育系杂交得到F<sub>1C</sub>,通过自交一代得到F<sub>2C</sub>;F<sub>1B</sub>与RI 2014S不育系杂交得到F<sub>1D</sub>,通过自交一代得到F<sub>2D</sub>;

3) 以F<sub>2C</sub>中的不育单株作为母本,以F<sub>1B</sub>为父本杂交得到F<sub>1</sub>,将F<sub>1</sub>自交一代得到F<sub>2</sub>,测验F<sub>2</sub>的育性,得到杂合株系,对杂合株系自交后代进行筛选,得到株高、花期适中的杂合株,对杂合株系自交8-9代得到性能稳定的品种。

[0013] 还可以,以F<sub>2D</sub>中的不育单株作为母本,以F<sub>1A</sub>为父本杂交得到F<sub>1</sub>,将F<sub>1</sub>自交一代得到F<sub>2</sub>,测验F<sub>2</sub>的育性,得到杂合株系,对杂合株系自交后代进行筛选,得到株高、花期适中的杂合株,对杂合株系自交8-9代得到性能稳定的品种。

[0014] 选择F<sub>2C</sub>和F<sub>2D</sub>中表型优良利于育种的单株,利用上述的燕麦隐性核不育系RI2014不育基因的分子标记方法鉴定其中的不育单株和可育单株。

[0015] 本发明的有益效果是:利用原始发现的隐形核不育皮燕麦“CAMS”和裸燕麦“80066”杂交构建重组自交系,筛选育性特征的自交系,培养筛选的不育系RI2014,该不育系可用于燕麦轮回育种的中间材料.优点是:1) 雄性不育系的不育性为隐形基因控制,其不育性在正常生长条件下不受光长和温度影响,是燕麦理想轮回选择中间材料。2) 不育系RI2014其基因组是皮燕麦和裸燕麦的混合体,与皮、裸燕麦杂交,杂交种均为可育。3) 不育系Nms2014小穗朝上,具有高产性能,可做优良品种的亲本,免去人工去雄杂交工序,提高杂交制种效率,节约人力,降低种子成本,同时提供杂交制种效率、种子纯度,保证制种质量的一条有效地途径。4) 本发明的雄性不育基因CAMS是一个新的雄性不育基因,能够方便快捷在苗期鉴别燕麦杂交育种中不育株与可育株,克服现有技术需要等到植株抽穗期才能鉴定育性并耗费大量人力、物力和时间的问题。5) 本发明包括CL1155,CL907,CL210,Uni2358,Uni2612,CL248和Uni2008,七个分子标记,与燕麦性状连锁,能够定位和标记燕麦雄性不育基因CAMS,将基因组DNA序列与燕麦育性基因联系起来,在植株的鉴定、品种的遗传背景、筛选目标单株,在品种改良和产量构成以及克隆性分化控制基因等方面有重要的应用意义。

## 附图说明

[0016] 图1 RI2014不育基因与本发明分子标记物之间的连锁遗传图谱;

图2为本发明的突变体RI2014的构建流程图;

图3为本发明分离的突变体RI2014在燕麦轮回育种中的应用流程图。

## 具体实施方式

[0017] 为了能更清楚地理解本发明的技术方案,下面结合附图对本发明进一步说明。

[0018] 实施例1:构建重组自交系,获得不育系。

[0019] 根据图2所示的技术路线,将原始发现的隐形核不育皮燕麦“CAMS”和裸燕麦“80066”杂交得到F<sub>1</sub>,利用F<sub>1</sub>自交一代获得F<sub>2</sub>代,从F<sub>2</sub>代选取不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”回交得到BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>,自交一代得到BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>,从BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交得到BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>,自交一代得到BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>,从BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>中选择不育的裸燕麦与裸燕麦“80066”继续回交得

到BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>,得到单株穗中全部是裸燕麦的材料,自交一代得到BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>,利用BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>单株穗中全部是裸燕麦的杂合可育单株自交得到BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>,BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>中每个家系选一粒种子自交,通过单粒传法构建重组自交系,在F<sub>12</sub>代筛选得到的裸燕麦不育系RI2014。

[0020] 将RI2014S用转录组开发的2073对标记,2014年冬天在中国太原山西农科院创新温室内,以RI2014不育单株RI2014S作母本,以三个裸燕麦品种:白燕2号、晋燕8号和坝蓂1号作父本分别进行杂交,以三个皮燕麦品种:蒙燕1号、坝燕6号和张燕4号作父本分别杂交,得到F<sub>1</sub>种子,将所得到的F<sub>1</sub>种子播种在2015年播种在中国太原山西农科院创新温室中试验,收获种子,考察结实率,得到如表所示的结果,证明不育系RI2014的不育单株RI2014S与不同皮燕麦、裸燕麦杂交得到的F<sub>1</sub>均可育。

[0021] 表本发明的不育系RI2014的不育单株RI2014S与不同裸燕麦皮燕麦杂交得到的F<sub>1</sub>结实率

		总株数	可育株数	不育株数	不育株率
裸	RI2014S×白燕2号	33	33	0	0
燕	RI2014S×晋燕8号	29	29	0	0
麦	RI2014S×坝蓂1号	35	35	0	0
皮	RI2014S×蒙燕1号	29	29	0	0
燕	RI2014S×坝燕6号	30	30	0	0
麦	RI2014S×张燕4号	26	26	0	0

[0022] 实施例2:定位群体

将突变体RI2014的不育单株RI2014S与燕麦品种“品燕2号”杂交,从自交一代中获得F<sub>2</sub>的分离群体,用来进行雄性不育基因的定位。通过田间性状调查表明:不育单株:可育单株分离比为1:3,不育单株表型出雄蕊发育不正常,或者雄蕊完全退化,详见其他证明材料照片。

[0023] 实施例3:父母本以及F<sub>2</sub>代个体基因组DNA的提取

父本为雄蕊和雌蕊均发育正常的单株,母本为雌蕊发育正常,雄蕊发育不正常的单株。

[0024] 用试剂盒法分别提取定位群体的父母本、173个的F<sub>2</sub>个体的基因组DNA,具体方法如下。

[0025] (1)将1.0克新鲜叶片,剪碎放入加入液氮的研钵中,用液氮研磨后,研磨好之后用小勺子舀到事先在液氮中冷却的离心管中,并在离心管上标注所研样品的名字,将离心管放于倒好液氮的冰盒中。

[0026] (2)把所需研磨的样品都研磨好之后,按试剂盒中的说明书步骤进行提取。

[0027] DNA抽提方法按照试剂盒法提取,所说的试剂盒可由市面购买获得,本发明专利实施例使用的是天根生化科技(北京)有限公司生产的植物基因DNA提取盒(DP350-03)试剂盒;

1)实验前在预热的GP1中加入巯基乙醇,使其终浓度为0.1%;在缓冲液GD和漂洗液PW中加入无水乙醇;

2)将研磨好的粉末迅速转移到预先装有700  $\mu$ l 65°C预热缓冲液GP1的离心管中,迅速

颠倒混匀后,将离心管放在65℃水浴20 min,水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次;

3) 加入700  $\mu$ l氯仿,充分混匀,12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心5 min;

4) 小心地将上一步所得上层水相转入一个新的离心管中,加入700  $\mu$ l缓冲液GP2,充分混匀;

5) 将混匀的液体转入吸附柱CB3中,12,000 rpm ( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心30 sec,弃掉废液。(吸附柱容积为700 $\mu$ l左右,可分次加入离心);

6) 向吸附柱CB3中加入500  $\mu$ l缓冲液GD(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心30 sec,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中;

7) 向吸附柱CB3中 加入600  $\mu$ l 漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心30 sec,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中;

8) 重复操作步骤7.

9) 将吸附柱CB3放回收集管中,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心2 min,倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液;

10) 将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加50-200  $\mu$ l洗脱缓冲液TE,室温放置2-5 min,12,000 rpm( $\sim$ 13,400 $\times$ g) 离心2 min,将溶液收集到离心管中;

缓冲液GP1(Buffer GP1)

缓冲液GP2(Buffer GP2)

缓冲液GD(Buffer GD)

漂洗液PW(Buffer PW)

洗脱缓冲液TE(Buffer TE)

吸附柱CB3(Spin Columns CB3)

收集管(2 ml)(Collection Tubes 2 ml)。

[0028] (3) 用0.8% 的琼脂糖凝胶检测基因组DNA。

[0029] (4) 将得到的父母本以及F<sub>2</sub>代的基因组DNA为模板,以分子标记扩增引物对进行扩增。

[0030] CL1155. GACATTGTCAAGACCTGTAAGCC;GCTCATGCCCTAACATTACAAC;

CL907. CTCATGTGAATGGAAGCCTGTAT;AACAAAGACTTCGGTGCATTCT;

CL210. TCTTGAAGGTCTGTTCTCTGAC;AAGAAGATAGAAGCCAAATCCGA;

Uni2358. TGAGAACACAATTGCTCAAAATG; CTGAAGTTTGGAGAACCAGAAGT;

Uni2612. CTCCTCTTCATGCCATTGTTAT; CTCCATGGCAACAAACTTAAC;

CL248. GGAATGCCATAACATGTACACAA; CCGACAGGATACACTGAGCG;

Uni2008. CTCTTCTCCTCTGCTCCTTCTT; CTTTCTGAGCAAGCACCATTAGT。

[0031] 实施例4:分子标记的制备

以实施例3中提取的父母本,或F<sub>2</sub>代的基因组DNA为模板,以分子标记扩增引物对(CL1155、CL907、CL210、Uni2358、Uni2612、CL248和Uni2008)进行PCR扩增。

[0032] PCR反应体系如下:

正向引物 0.8 $\mu$ L

反向引物 0.8 $\mu$ L



DNA模板 1 $\mu$ L  
ddH<sub>2</sub>O 2.4 $\mu$ L  
MIX 5 $\mu$ L

PCR反应程序如下:

94℃预变性120s;94℃变性30s,57℃退火45s,72℃延伸40s,运行35个循环;最后72℃延伸600s。PCR扩增产物可以在4℃保存。

[0033] PCR产物电泳检测:聚丙烯酰胺凝胶电泳,照胶并记录。

[0034] 引物的有效性和多态性:在此有效性是指是否有扩增产物,多态性是指父母本见扩增产物的片段大小有差异。

[0035] 按照如下的筛选标准进行引物的筛选:父母本及F<sub>1</sub>均有扩增产物,并且父母本扩增产物有清晰的带型且位置有差异,F<sub>1</sub>表现为有父母本带型的杂合带型,即有父本和母本带型的两条带。

[0036] 筛选结果,根据上诉筛选标准,从设计的2073对引物中筛选出7对引物。

[0037] 遗传图谱构建

用开发的7对引物具有多态性的分子标记对F<sub>2</sub>群体的173个个体进行PCR检测,所用的模板为制得的F<sub>2</sub>群体的173个个体的基因组DNA。

[0038] 对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,得到分子标记引物对173个个体扩增的结果。

[0039] 将全部电泳结果进行数据统计分析,具体方法如下:将F<sub>2</sub>群体单株扩增条带为父本型记为a,扩增条带为母本型记为b,扩增条带同时含有父本型和母本型的记为h,带型模糊或者缺失记为-,相当于数据缺失,最终得到F<sub>2</sub>群体的173个个体的XX对引物扩增的基因型数据。比如,用第一对引物得到的173个个体的数据是a,a,h,b,.....共173个数据,用第二对引物得到的173个个体的数据是b,a,h,b,.....共173个数据,.....共173个数据,共7对引物分别统计,所得即为F<sub>2</sub>群体的基因型数据。

[0040] 用MapMaker 3.0软件,进行遗传连锁图谱绘制,得到遗传连锁图。从该得到的遗传连锁图上可确定7对引物的位置及与燕麦育性基因的遗传距离。

[0041] 基因定位

根据173个个体的育性表型,与父本型性状相似的记为a,与母本性状的记为b。得到173个个体的表型数据,将173个个体的表型数据与之前得到的173个个体的基因型数据进行比较,相似高则代表该标记与育性性状紧密连锁,并将育性基因定位在遗传连锁图谱上。

[0042] 花药内部花粉活性检测:

F<sub>2</sub>单株中,可育单株在始花期、盛花期、开花末期均有花粉;不育单株在始花期、盛花期、开花末期均无花粉。扫描电镜观察花药压片显示(详见其他证明材料照片),F<sub>2</sub>不育株花药干瘪,表面无褶皱,内部椭圆形的花粉粒很少,个别花药中有成熟花粉粒,但其形态畸形无活性;可育株花药饱满,表面褶皱多,内部被椭圆形花粉充满,可育花粉椭圆形,活性良好。

[0043] 不育株与不同品种测交的F<sub>1</sub>代,育性恢复;恢复育性的植株自交后可育株与不育株呈3:1分离;不育株与恢复育性的F<sub>1</sub>回交,BC<sub>1</sub>育性为1:1分离。说明不育性状是由一对隐性核基因控制的。

组合		地点	总株数	可育株数	不育株数
CA 不育株 XCA 可育株	F <sub>1</sub>	温室	43	43	0
CA 不育株 XCA 可育株	F <sub>1</sub>	大田	37	37	0
	F <sub>2</sub>	大田	109	82	27
	F <sub>2</sub>	温室	84	62	22

[0044] 实施例5:不育系RI2014的应用

本发明的不育系,与皮燕麦、裸燕麦杂交均可得到结实率较高的F<sub>1</sub>,后代F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>于不同年份在大田或温室种植,F<sub>1</sub>植株的育性表现全部可育,F<sub>2</sub>无论在温室或大田及不同年份,群体中始终出现一些不育株。本发明的不育系不育性状稳定,环境中温度和光照等因素不能影响其育性变化,不属于温、光敏不育,具有高产性能,杂交时可免去“人工去雄”的步骤,苗期鉴定可以利用本发明开发的标记进行辅助选择,因此该不育系对提供燕麦杂交获得优良性状提供了很重要的中间材料。

[0045] 本实施的技术路线可参见图3,图3是申请人设计的包括本发明不育系RI2014应用于燕麦育种的总体技术流程:首先选择皮燕麦和裸燕麦优良育种亲本各两个骨干品种(这些“骨干品种”是在生产上具有优良性状的品种,都是可以得到的,对于本领域的技术人员而言按照通用的标准选择作为本实例的“骨干品种”并不苦难,为描述清楚,申请人将这些“骨干品种”分别编号为“骨干品种1、2、3、4”,是指代不同的品种,但是都是来源于优质和高产品种的材料),编号骨干品种1、2、3、4,其中骨干品种1和2配对使用,骨干品种3和4配对使用,按照常规杂交方法分别得到皮燕麦杂交F<sub>1</sub>(或称为F<sub>1A</sub>),裸燕麦品种F<sub>1</sub>(或称为F<sub>1B</sub>);以F<sub>1A</sub>和F<sub>1B</sub>分别作为父本,以本发明的不育系单株RI2014S作为母本,以F<sub>1A</sub>和RI2014S杂交,得到F<sub>1C</sub>,以F<sub>1B</sub>和RI2014S杂交,得到F<sub>1D</sub>;之后再分别自交一代得到F<sub>2C</sub>和F<sub>2D</sub>;选择F<sub>2C</sub>和F<sub>2D</sub>中表型优良利于育种的单株,利用本发明开发出的标记引物鉴定其中的不育单株和可育单株,分别以F<sub>2C</sub>中的不育单株为母本,用F<sub>2D</sub>中的可育单株的花粉进行授粉,同时以F<sub>2D</sub>中的不育单株为母本,用F<sub>2C</sub>中的可育单株的花粉进行授粉,获得新的F<sub>1N</sub>;将新的F<sub>1N</sub>自交,从F<sub>2</sub>代开始,实施常规选择育种(常规选择育种方法为报道的方法),选择农艺性状优良的可育单株(选择农艺性状优良可育单株的方法为报道的方法),通过连续自交和选择(连续自交和选择的方法为报道的方法),最终得到花期稳定、株型适中、产量高产的稳定的燕麦新品系。

[0046] 另:在本发明中描述的RI2014为具有燕麦不育基因的群体总称,RI2014S具有燕麦不育基因单株的称谓编号。

[0047] 以上所述仅是本发明的较佳实施方式,故凡依本发明专利申请范围所述的构造、特征及原理所做的等效变化或修饰,均包括于本发明专利申请范围内。

## 序列表

<110>	山西省农业科学院农作物品种资源研究所	
<120>	燕麦隐性核不育基因分子标记及应用	
<130>	2018001	
<141>	2019-01-11	
<160>	14	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	gacattgtca agacctgtaa gcc	23
<210>	2	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	gctcatgccc taacattaca act	23
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	ctcatgtgaa tggaagcctg tat	23
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	aacaaagact tcggtgcatt ct	22
<210>	5	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	tcttgaagg tctgttctet gac	23
<210>	6	

<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 6	
aagaagatag aagccaaatc cga	23
<210> 7	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
tgagaacaca attgctcaaa atg	23
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
ctgaagtttg gagaaccaga agt	23
<210> 9	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
cttcctcttc atgccattgt tat	23
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
ctccatggca acaaacactt aac	23
<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
ggaatgcat aacatgtaca caa	23
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

---

<400> 12	
ccgacaggat acactgagcg	20
<210> 13	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 13	
ctctttcttcc tctgctcctt ctt	23
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 14	
ctttctgagc aagcaccatt agt	23

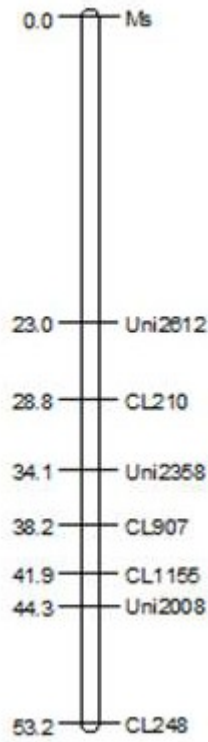


图1

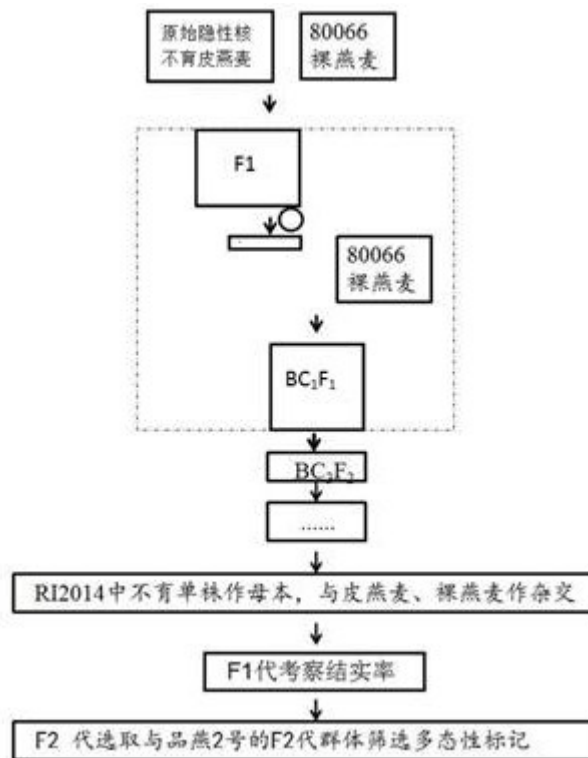


图2

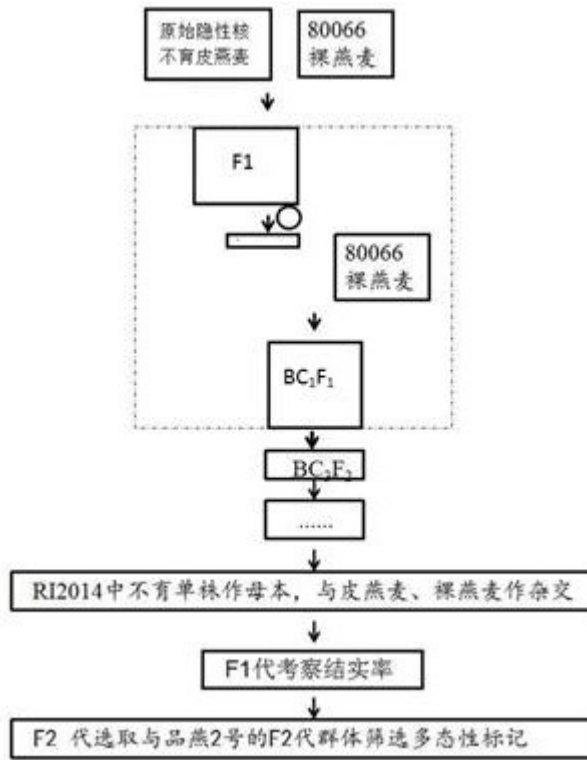


图3